

筋弛緩因子について〔I〕

—主として溶血中の弛緩因子について—

馬 原 逸 郎

札幌医科大学生理学教室 (主任 永井教授)

Studies on the Relaxing Factor of the Muscle [I]

— On a Relaxing Factor in Human Hemolysate —

By

ITSURŌ MAHARA

Department of Physiology, Sapporo University of Medicine
(Chief: Prof. T. NAGAI)

actomyosin (AM) 系を以つてする筋肉の研究は先ずその収縮機構の解明¹⁾²⁾に始まり, actin と myosin の結合と AM による adenosinetriphosphate (ATP) の分解 energy がこれに対応する^{3)~5)}ものと一応結論付けられている。

次に弛緩に関しては収縮の場合における ATP の如く AM 系に対し特異的に働くものの存在は認められず, 高濃度 ATP, pyrophosphate, salyrgan 等数多くのものが ATP 短縮した glycerol 筋を一定荷重下において伸展せしめる事実等からして, contraction の active process に対し passive な process であろうと想定されている^{3)~5)}。

われわれが弛緩機構を論ずる場合に上記弛緩作用の中で最も注目されるのは, やはり生理的に現存する ATP (高濃度) による弛緩作用である。しかししてさらに興味を引かれるのは最近 Marsh^{6),7)}, Bendall^{8),9)}, Lorand¹⁰⁾, 江橋¹¹⁾等が生理的濃度の ATP でも筋肉の抽出液と共に作用させた場合,

glycerol 筋の伸展を可能ならしめると報告したことである。

彼等はそれぞれの抽出法で弛緩因子を得, これ等の作用を Bendall は myokynase, Lorand は creatine-phosphopherase (CP-pherase) の酵素作用であることを純粋な酵素について実験を行い互いに強調しているが, ATP の再合成が弛緩に対応するという点では両者の見解は一致している。なお, Bendall は ATP 再合成の他になん等かの複雑な機構の存在を推定し Lorand は他の ATP 合成系においても同様な結果が得られるのではないかということを示している。

われわれは彼等が筋肉の抽出液を用いたのに対し溶血中にも transphosphorylase^{12),13)}は存在するのでこれ等の酵素系を用いて glycerol 筋の伸展を期待し, 両者の共通性を追求することにより弛緩因子を解明せんと試みた。

- 1) Szent-Györgyi, A.: Chemistry of Muscular Contraction (1947).
- 2) Szent-Györgyi, A.: Chemical Physiology of Contraction in Body & Heart Muscle (1953).
- 3) 永井・他: 高分子 3, 203 (1954).
- 4) 永井・他: 札幌医誌 5, 75 (1954).
- 5) Weber, H. H.: Advances Prot. Chem. 7, 161 (1952).
- 6) Marsh, B. B.: Biochim. Biophys. Acta 9, 229

(1952).

- 7) Marsh, B. B.: Nature 167, 1065 (1951).
- 8) Bendall, J. R.: Nature 173, 548 (1954).
- 9) Bendall, J. R.: Nature 170, 1058 (1952).
- 10) Lorand, L.: Nature 172, 1181 (1953).
- 11) 藤田: 日本薬理誌 50, 183 (1954).
- 12) Zacharias, D.: Phosphorus Metabolism 1, 171 (1951).
- 13) Rapoport, S.: J. Biol. Chem. 183, 507 (1950).

実験方法

1) 血液中の弛緩因子と ATP 混合液の作製。乾熱滅菌した注射器を以て人血液を採り硝子棒で静かに攪拌脱線維した後血清と血球を遠心分離、血清を $16 \times 10^{-2} \text{M}$ KCl で 3 倍、赤血球を蒸留水で 3 倍に稀釈強く振盪して溶血せしめ、両者を 2:3 の割合に混和 K+Na の濃度を $16 \times 10^{-2} \text{M}$ に補正した。

この弛緩因子の glycerol 筋に対する作用を検する場合には上記溶血液が 2 倍量に稀釈され終濃度 $4 \times 10^{-3} \text{M}$ ATP/ $16 \times 10^{-2} \text{M}$ K/ $5 \times 10^{-3} \text{M}$ MgCl_2 , pH=7 になるように混和しこれ等を所定の時間 22°C の温浴中で反応させた後使用した。

2) 筋肉弛緩因子と ATP 混合液の作製。筋弛緩因子は Bendall の方法で抽出 (M・B-Factor), 溶血弛緩因子と同様に $4 \times 10^{-3} \text{M}$ ATP/ $16 \times 10^{-2} \text{M}$ K/ $5 \times 10^{-3} \text{M}$ MgCl_2 , pH=7 として使用した。なおこの混合液は 1/3 量の M・B-Factor を含み incubate の時間と弛緩効果との関係を見る場合はさらにこれを 1/3 或は 1/4 に稀釈した。

3) glycerol 筋: A. Szent-Györgyi に従って作製し 0.3~0.4×20 mm に分離して使用した。

4) glycerol 筋の mechanogram: 丸山¹⁴⁾に従って isotonic lever を使用, 荷重 200 mg, 時間目盛 5 分, 液温 22°C で実施した。

5) ATP: われわれの教室で抽出せる Ba-salt (free ATP として純度 40%) を用いて K-salt として使用。

6) creatine phosphate (CP) の定量法: A. M. Alkseeva 法を改良した宮崎¹⁵⁾の方法により上記弛緩因子と ATP の混合液を過塩素酸で除蛋白後測定した。

7) 7 分水解磷 (7'P) の定量: CP の定量の場合と同様に過塩素酸で除蛋白し, 1N 塩酸で 7 分間 100°C 温浴中に水解後 Bodansky の方法で無機磷を測定した。

実験成績

実験 1: 溶血弛緩因子の弛緩効果及び $\text{CH}_3\text{I}\cdot\text{COOK}$ と NaF の影響

Fig. 1 に見る如く溶血液と ATP を 30 分 incubate させこれを glycerol 筋に作用させると, ATP だけでは伸展を来たさない条件で短縮に続いて明らかに弛緩が見られる。またこれに $\text{CH}_3\text{I}\cdot\text{COOK}$ を加えて incubate させたものは弛緩が強くおさえられ, NaF を加えた場合も弛緩作用の減弱が見られた。なおこの場合に用いた $\text{CH}_3\text{I}\cdot\text{COOK}$ 及び NaF は glycerol 筋に対して殆ど影響のない濃度である。

実験 2: 溶血液と ATP の incubate 時間と弛緩効果との関係

Fig. 2, 1, 3 を順次に検討して見ると, Fig. 2 は 10 分, Fig. 1 は 30 分, Fig. 3 は 60 分間 incubate している。しかして弛緩効果は 30 分の場合が最も強く次いで 60 分,

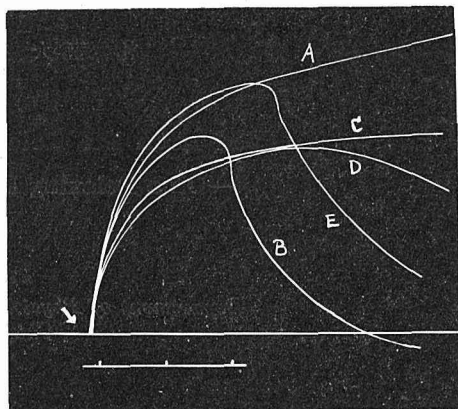


Fig. 1. Effects of human hemolysate as a relaxing factor and inhibition of the relaxation by $\text{CH}_3\text{I}\cdot\text{COOK}$ or NaF. (Incubation time of mixture: 30 min.)

Each mixture contains:

- A. $4 \times 10^{-3} \text{M}$ ATP/ $16 \times 10^{-2} \text{M}$ KCl/ $5 \times 10^{-3} \text{M}$ MgCl_2
- B. A+hemolysate
- C. A+hemolysate+ $\text{CH}_3\text{I}\cdot\text{COOK}$ ($12 \times 10^{-4} \text{M}$)
- D. A+hemolysate+NaF ($15 \times 10^{-4} \text{M}$)
- E. A+hemolysate+glucose ($2 \times 10^{-2} \text{M}$).

Temperature: 22°C. Time marks: 5 min.

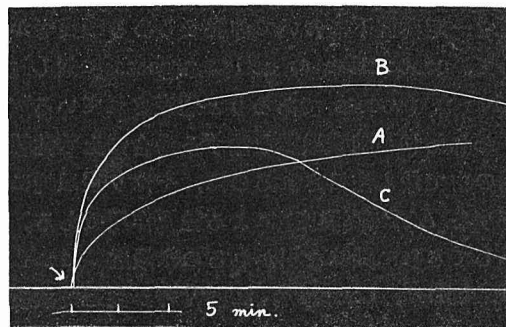


Fig. 2. Accelerating effect of glucose on the relaxation induced by hemolysate. (Incubation time of mixture: 10 min.)

Each mixture contains:

- A. $4 \times 10^{-3} \text{M}$ ATP/ $16 \times 10^{-2} \text{M}$ KCl/ $5 \times 10^{-3} \text{M}$ MgCl_2
- B. A+hemolysate
- C. A+hemolysate+glucose ($2 \times 10^{-2} \text{M}$).

Temperature: 22°C. Time marks: 5 min.

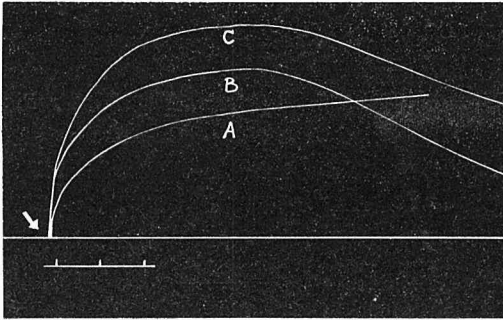


Fig. 3. The relaxation caused by prolonged incubation of ATP and hemolysate.
(Incubation time of mixture: 60 min.)

Each mixture contains:

- A. $4 \times 10^{-3} \text{M}$ ATP/ $16 \times 10^{-2} \text{M}$ KCl/ $5 \times 10^{-3} \text{M}$ MgCl_2
- B. A + hemolysate
- C. A + hemolysate + glucose ($2 \times 10^{-2} \text{M}$).

Temperature: 22°C . Time marks: 5 min.

10 分の順である。このことは弛緩効果をあらわす場合に incubation time に一定の maximum があることを示している。

実験 3: 葡萄糖による弛緩効果の促進

Fig. 2 に見る如く 10 分 incubate の場合葡萄糖を加えない場合は未だ充分弛緩効果をあらわしていないが、葡萄糖を添加せるものは glycerol 筋を弛緩せしめている。これに反し Fig. 1, 3 の場合は glucose 添加の例が弱い弛緩作用を示したが、このことは glucose 添加の場合 incubate 時間の maximum が 10 分前後にあり次第にその

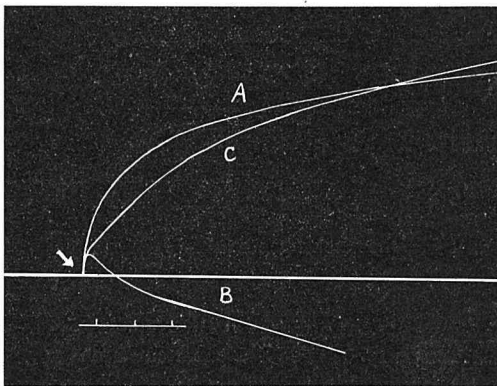


Fig. 4. The relaxation induced by M·B-Factor and ATP.
(Incubation time of mixture: 5 min.)

Each mixture contains:

- A. $4 \times 10^{-3} \text{M}$ ATP/ $16 \times 10^{-2} \text{M}$ KCl/ $5 \times 10^{-3} \text{M}$ MgCl_2
- B. A + M·B-Factor
- C. A + M·B-Factor (1/4).

Temperature: 22°C . Time marks: 5 min.

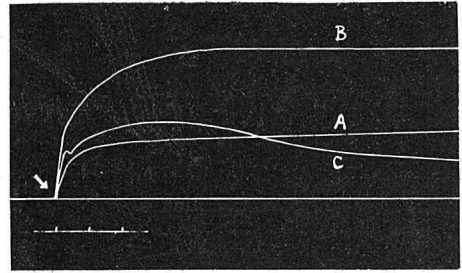


Fig. 5. The relaxation induced by M·B-Factor and ATP.
(Incubation time of mixture: 60 min.)

Each mixture contains:

- A. $4 \times 10^{-3} \text{M}$ ATP/ $16 \times 10^{-2} \text{M}$ KCl/ $5 \times 10^{-3} \text{M}$ MgCl_2
- B. A + M·B-Factor
- C. A + M·B-Factor (1/3).

Temperature: 22°C . Time marks: 5 min.

作用が減弱したと考えるべきであろう。

実験 4: M·B-Factor の濃度及び incubate 時間と弛緩効果との関係

Fig. 4, 5 に示した如く M·B-Factor と ATP を incubate させる時間が 5 分の場合は factor 濃度の濃い方が強い弛緩効果を示し、60 分の場合は薄いものが溶血因子の如き弱い弛緩効果をあらわした。このことは factor 量の少ないもの程長時間の incubation が必要なことを示している。

実験 5: γP の減少及び合成される CP の有無

溶血因子と ATP を混合しこの γP を追求して見るとその減少が見られたが CP の合成は全然証明出来なかつた (Fig. 6 参照)。

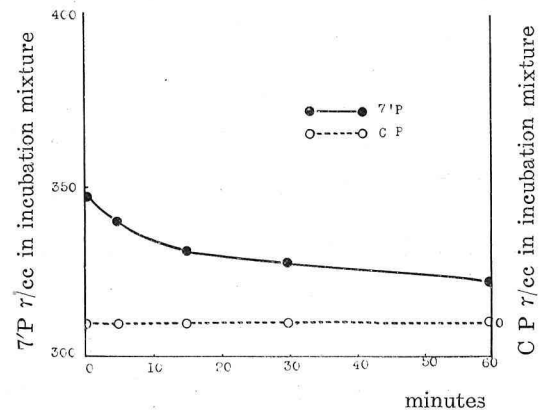


Fig. 6. Disappearance of added ATP (γP) in the incubation mixture.

The mixture contains:

- $4 \times 10^{-3} \text{M}$ ATP/ $16 \times 10^{-2} \text{M}$ KCl/ $5 \times 10^{-3} \text{M}$ MgCl_2
- and hemolysate.

Temperature 22°C .

以上の各成績は数回の実験によりその再現性を確めた。

考 按

以上溶血弛緩因子による弛緩効果について種々実験を行ったが、これ等の成績について 2, 3 の考察を加えて見る。

I. 溶血弛緩因子の弛緩作用: Fig. 1~3 に示された如く溶血中には明らかに ATP と incubate することにより glycerol 筋を弛緩せしめる因子の存在が認められる。このことは Bendall, Lorand 等の報告した弛緩因子と全く同じ成績である。但し溶血の場合は弛緩効果弱く M・B-Factor を稀釈したものと同様 (Fig. 4, 5 参照) であることから、恐らく作用機序は同じであるが M・B-Factor よりも因子の濃度が稀薄なためであると解される。なお Fig. 5 の稀釈されない M・B-Factor と ATP を 60 分間 incubate させた場合弛緩効果が減ずることは横山も認めているが、この例の如く収縮を促進した事実は著者の他の例に於ても見られなかつたことでこれについてはさらに検討を要する。

II. 溶血弛緩因子の本態: 1) この問題を論ずる場合に重要なことは先ず弛緩因子の本態が酵素 (作用) であるかどうかということである。

この点を明かにするために著者は incubate 時間を変えてこれと弛緩効果との関係を比較して見た。その結果弛緩因子と ATP の incubate 時間というもののがかなり重要な意義を持つていることが実験 2 において明かである。即ち incubate しない溶血液+ATP そのままでは弛緩効果なくまた一定の時間を超過したものも次第に弱い弛緩作用を示した。この点からして pyrophosphate, salyrgan 等の chemical agent と区別することが可能であり、chemical agent であれば当然時間的变化はない筈である。

また弛緩作用が酵素反応の inhibitor と考えられる $\text{CH}_2\text{I}\cdot\text{COOK}$, NaF 等により影響されることによつても酵素であるということは裏付けられる。即ち incubate の間の反応が inhibitor により抑制されたと解すべきであろう。

2) 以上弛緩因子の本態は大体酵素であるが、次にはその酵素がどんな酵素であるかということが問題となつてくる。

Bendall 及び Lorand は彼等の弛緩因子についてそれぞれ myokinase, CP-pherase の純粋なもので実験を行い、大体彼等の factor なるものの本態もそれぞれの ATP 合成系の酵素に求めている。これに関し横山¹⁶⁾は CP の合成能の検討から、Bendall-Factor¹⁷⁾と Lorand-Factor¹⁸⁾

では相異なることを証明し、前者には CP の合成能なく後者には CP の合成酵素の含まれていることを指摘している。

著者も横山に従つて CP の合成を検して見たが、Fig. 6 に示したように全然 CP の出現なく CP-pherase の溶血液における存在は先づ考えられない。しかるに P は減少しているので ATP の分解は明かである。この ATP の分解が弛緩作用の關係のない系において行われたと考えることも出来るが、弛緩作用と incubate 時間との関係を考え ATP と incubate して始めてその作用をあらわす点からして、溶血液中に存在する弛緩因子としての酵素が ATP と反応しているものと解すべきであろう。さらに弛緩作用が $\text{CH}_2\text{I}\cdot\text{COOK}$, NaF 等により抑制され葡萄糖によつて促進されることを併せ考えるならば、この酵素は glycolysis に関係ある hexokinase, phosphohexokinase 以下の酵素系であろうと推定することが出来る。

次にこれ等の phosphokinase の pH optimum, inhibitor, stability 等を検討して見る。K. Bailey¹⁷⁾によれば hexokinase は葡萄糖または高塩濃度中でなければ pH 7 では急速に activity がなくなり pH 7.9 と 38°C の環境では 5 分間で完全に非活性化される。pH optimum は pH 8 で $\text{CH}_2\text{I}\cdot\text{COOK}$ により抑制され NaF も弱い抑制作用を示す。また Stumpf¹⁸⁾によれば phosphohexokinase は幅の広い pH optimum を示し 5~11 位で 6 と 9 に 2 つの peak があり iodoacetamid により抑制される。これ等のことからして大体安定度は低く以前に Bendall が報告したことと一致し、pH 7 で充分活性はあるということが出来る。なお inhibitor の問題に関し Marsh は彼の factor について $\text{CH}_2\text{I}\cdot\text{COOK}$ は activity を抑制する作用はないといつてゐるが、筋肉の抽出液は酵素の濃度が大きなためであり同濃度の inhibitor では溶血因子の如く薄い場合に抑制作用が判然とあらわれるのであろう。この意味でわれわれの用いた溶血因子は inhibitor 及び activator の効果を見るのに好都合であつた。以上のことからしてこれ等の phosphokinase がわれわれの弛緩因子の中で大きな役割を演じているものということが出来る。

III. 弛緩因子の作用機構に対する見解: 前項で著者の溶血弛緩因子が酵素であり、chemical agent でないことを結論したが、その作用弱くこれを以て筋肉の弛緩に対応すると考えることは出来ない。しかしこれ等の酵素は血液に含まれるような少量ではなく、実際には筋肉中に多量に存在して充分弛緩効果を現わし得るものと想定することが出来る。

16) 横山: 生体の科学 6, 129 (1954).

17) Bailey, K. et al.: Biochem. J. 42, 60 (1948).

18) Stumpf, P. K.: Phosphorus Metabolism 2, 40 (1951).

次に酵素作用と弛緩の問題であるがこれにはなお多くの難点があり、弛緩に際し酵素反応そのものが AM-ATP 系と重要な関係を有するものか或は反応の product が chemical agent 的に作用するものか全く不明である。

Weber^{19),20)} は弛緩因子と ATP 濃度との関係を検討し因子が ATP による ATPase の Eigenhemmung を低濃度側にずらす作用のあることを強調し、ATP 分解の阻止が弛緩因子の作用機序であろうと結論している。また Bendall, Lorand による myokinase, CP-pherase の ATP 再合成系における実験も事実であり、著者の酵素系においても ATP の再合成を主張することも出来る。

しかし ATP 再合成と弛緩との関係は明かではなくやはり Bendall や横山のいう如く、ATP 再合成の他に Weber の ATP 分解阻止及びさらに ATP と factor との間の複

雑な reaction complex が明かにされなければならない。

結 語

1) 溶血液中に ATP と共存下に glycerol 筋を弛緩せしめる物質の存在することを確認、この物質が酵素であり chemical agent でないことを実証した。

2) この酵素は $\text{CH}_3\text{I}\cdot\text{COOK}$ 及び NaF により抑制され葡萄糖により activate されることから glycolysis に関係のある hexokinase, phosphohexokinase 等の酵素系であろうと想定した。

(昭和 29. 12. 28 受付)

Summary

1) It has been revealed that human hemolysate contains a factor inducing relaxation of glycerinated rabbit muscle fiber in the presence of ATP, and that this factor is an enzyme and not a chemical agent such as pyrophosphate etc.

2) The relaxation occurring with the factor (human hemolysate) and ATP was inhibited by mono-iodoacetate or sodium fluoride and activated by an addition of glucose during the incubation of the factor and ATP. Hence it is suggested that the aforesaid factor may be the enzymes in glycolysis e. g. hexokinase, phosphohexokinase etc.

(Received Dec. 28, 1954)

19) Weber, H. H. & Hasselbach, W.: Biochim. Biophys. Acta 11, 160 (1953).

20) Weber, H. H.: Biochim. Biophys. Acta 12, 150 (1953).